

Natürliche Kollagenase-Inhibitoren

Edeltraud Rodegast

1981

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Hans Fritz

Natürliche Kollagenase - Inhibitoren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Edeltraud Rodegast

München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 10. 1981



I. Vorkommen und Bedeutung von Kollagenasen	1
1. Aufbau des Kollagens	1
2. Kollagenasen	2
a. Wirkung der Säugetier-Kollagenasen	2
b. Wirkung der Säugetier-Kollagenasen auf die verschiedenen Kollagentypen	4
c. Eigenheiten der Säugetier-Kollagenasen	4
d. Molekulargewicht	4
e. Regulation der Kollagenaseaktivität	5
f. Lokalisation der Kollagenasen	5
II. Kollagenase - Hemmstoffe	6
III. Inhibitoren der Kollagenase	7
1. Kollagenasehemmung durch α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin	8
2. β_1 -Antikollagenase	10
3. Kollagenaseinhibitoren aus Knorpel und Aorta	12
IV. Eigene Arbeiten zur Isolierung der von Kuettner und Mitarb. beschriebenen Inhibitoren	14
1. Material und Methoden	15
2. Enzymteste	17

3. Aufarbeitung und Extraktion der Rinderaorta	20
4. Überprüfung der Wirkung des Guanidinhydrochlorid auf Trypsin, Chymotrypsin und Elastase	30
5. Übersicht über alle getesteten Substanzen	31
V. Ergebnisse	33
Zusammenfassung	39
Literaturangabe	40
Lebenslauf	44

I. Vorkommen und Bedeutung von Kollagenasen

Die erste Wirbeltier-Kollagenase wurde 1962 von Groß & Lapiere (3) im Kaulquappenschwanzgewebe entdeckt. Seitdem wurden Kollagenasen in vielen Säugetier- und menschlichen Bindegeweben, in zirkulierenden Leukozyten, in Thrombozyten, in Epithelgeweben und im Exsudat bei pathologischen Prozessen mit erhöhtem Kollagenabbau entdeckt. Frühere Versuche, Kollagenasen aus Gewebshomogenaten zu isolieren scheiterten, vermutlich wegen der in den Geweben vorhandenen Inhibitoren. Erst Methoden, bei denen die Gewebs- und Plasmainhibitoren zuvor denaturiert oder gebunden wurden ermöglichten es, Kollagenasen in fast allen Geweben und in pathologischen Prozessen mit Kollagenolyse nachzuweisen. Mittlerweile sind die Kollagenasen und ihre Wirkungsweise schon recht genau untersucht. Über die Regulation der Kollagenaseaktivität ist bislang aber nur sehr wenig bekannt.

1. Aufbau des Kollagens (4)

Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil des menschlichen und tierischen Organismus. Es macht etwa 30 % des Gesamtkörperproteins aus. In Wasser, verdünnten Säuren und Laugen ist es unlöslich und in nativer Form resistent gegenüber proteolytischen Enzymen. Mit einem Gehalt von 30 % Glycin, 12 - 14 % Hydroxyprolin und 12 % Prolin weist es eine charakteristische, bei den Säugetieren außerordentlich konstante Zusammensetzung auf. Kollagen besitzt eine hochgeordnete makromolekulare Struktur mit jeweils 3 verknüpften α -Helixketten. Es hat ein Molekulargewicht von ungefähr 290 000. Die Primärstruktur der α -Kette ist typisch für den Ursprung im Gewebe:

Typ I : $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ Gewöhnliches Kollagen, das in den meisten Geweben vorhanden ist.

Typ II : $[\alpha_1(II)]_3$ Gelenk- und Embryonalkollagen.

Typ III: $[\alpha_1(\text{III})]_3$ In Blutgefäßen, Haut und Weichteilgeweben (möglicherweise mit Retikulin identisch).

Typ IV : Basalmembrankollagen, ein komplexes Molekül, enthält beträchtliche Mengen an 3-Hydroxyprolin (die anderen Kollagene enthalten nur 4-Hydroxyprolin), Cystein und charakteristische Glykoproteine.

Das in den Fibroblasten gebildete Prokollagen wird in den Extrazellulärraum sezerniert. Dabei wird ein Peptid abgespalten und Kollagen gebildet, das sich zu Fibrillen zusammenlagert.

2. Kollagenasen

a. Wirkung der Säugetier-Kollagenasen (4)

Kollagenasen sind Enzyme, die Kollagen unter physiologischen Bedingungen abbauen. Sie sind extrazellulär bei neutralem pH wirksam. Der enzymatische Abbau nativen Kollagens läßt sich nur durch die Beteiligung von Kollagenasen erreichen.

Enzymatische Stufen des Kollagenabbaus:

1. Depolymerisation innerhalb der Kollagenfibrillen durch eine "Depolymerase" (evtl. Elastase).
2. Spaltung im helikalen Teil des Kollagens durch spezifische, neutrale, extrazelluläre Kollagenasen. Das Kollagenmolekül wird durch spezifische Kollagenasen vom Aminoende her in zwei Fragmente gespalten: das längere, 75 % Fragment TC^A oder A-Stück und das kürzere, 25 % Fragment TC^B oder B-Stück.
3. a) Teilung der Fibrillen durch spezifische, neutrale, extrazelluläre Kollagenasen mit anschließender Phagozytose und lysosomaler Verdauung der Fibrillenfragmente durch lysosomale Hydrolasen (Kathepsin B und/oder kollagenolytische Kathepsine) innerhalb der Phagolysosomen

und/oder
3. b) Hitzedenaturierung einfacher Molekülfragmente, die durch die spezifische Kollagenase entstanden sind, und Abbau (intra- oder extrazellulär) zu Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von ungefähr 10 000 durch extrazelluläre, neutrale, gelatinespezifische Proteinasen und durch extrazelluläre, neutrale, nichtspezifische Proteinasen.
4. Weitere Spaltung zu Peptiden, die klein genug sind, um im Urin ausgeschieden zu werden oder zu Peptiden, die komplett intrazellulär durch unbekannte Peptidasen abgebaut werden.

b. Wirkungsweise der Säugetier-Kollagenasen auf die verschiedenen Kollagentypen

Obwohl die Sequenz des TC^B-Stückes am Aminoende nach der Spaltung an α_1 (I)- und α_1 (II)-Kollagen sehr einfach ist, bauen mehrere Enzyme (aus rheumatischer Synovialflüssigkeit, menschlichen polymorphkernigen Leukozyten und menschlicher Haut) Typ II-Kollagen in Lösung etwa 5 - 6 mal langsamer ab als Typ I-Kollagen. Die Hauptunterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Substraten sind der höhere Gehalt an Hydroxylysin und die stärkere Glykolysierung des letzteren. Typ III-Kollagen wird von Kaninchentumor-Kollagenase mit der gleichen Geschwindigkeit abgebaut wie Typ I-Kollagen, während das Basalmembran-Kollagen unter gleichen Bedingungen (25° C) nicht gespalten wird. Die Faktoren, die die Kollagenolyse verlangsamen, müssen deshalb in der Primär- oder Sekundärstruktur des Kollagens bedingt sein (22, 23).

c. Eigenheiten der Säugetier-Kollagenasen

Alle untersuchten Kollagenasen scheinen metallabhängige Enzyme zu sein. Sie sind nur in Gegenwart von bestimmten Metallkationen aktiv und werden durch chelatbildende Agentien vollständig gehemmt. Zn^{2+} dürfte ein wesentlicher Bestandteil der Säugetier-Kollagenasen sein und Ca^{2+} ist für die Aktivität notwendig (18).

d. Molekulargewicht

Gegenwärtig liegt die niedrigste Schätzung des Molekulargewichts für gereinigte Kollagenasen aus rheumatischer Synovia, Kaninchen-Synovialfibroblasten und Kaninchentumoren bei 32 000 bis 33 000 Dalton. Für eine andere Gruppe von Kollagenasen wurde ein Molekulargewicht von 60 000 - 65 000 gefunden (menschliche Haut, Rindergingiva, menschliche polymorphkernige Leukozyten, menschliche Kornealfibroblasten und Kaninchenbindehaut) (4).

e. Regulation der Kollagenaseaktivität

Es wird allgemein angenommen, daß inaktive extrazelluläre Kollagenasen existieren, aber es ist noch nicht geklärt, ob diese latenten Enzyme, die durch milde Proteolyse "aktiviert" werden, "Proenzyme" (Zymogene) (12) oder Enzym-Inhibitor- bzw. Enzym-Substrat-Komplexe (13) darstellen.

In Extrakten menschlicher polymorphkerniger Leukozyten wurde Kollagenase sowohl in aktiver als auch in latenter Form nachgewiesen. Durch neutrale Proteasen kann die latente Form der Kollagenase aktiviert werden.

Macartney und Tschesche (8) wiesen kürzlich nach, daß die latente Kollagenase der Leukozyten als Enzym-Inhibitor-Komplex vorliegt. Durch Aktivierung der latenten Form erhält man das aktive Enzym (Molekulargewicht $\sim 65\ 000$) und einen Inhibitor (Molekulargewicht $\sim 24\ 000$), die sich durch Gelfiltration abtrennen lassen. Das isolierte Inhibitorprotein ist in der Lage, kollagenolytische Aktivität zu hemmen.

Die Kollagenolyse ließ sich aktivieren durch inaktive proteolytische Enzyme, Cystin, Glutathion, Insulin und p-Chloromercuribenzoat. Blockiert werden konnte die kollagenolytische Aktivität durch Vorinkubation mit Cystein oder reduziertem Glutathion.

Der Inhibitor enthält eine essentielle Sulfhydrylgruppe, die bei der Komplexbildung mit einer Cystingruppe des Enzyms reagiert, so daß beide Partner über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft werden.

f. Lokalisation der Kollagenasen

Mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden wurde festgestellt, daß Kollagenasen extrazellulär auf Fibrillenkollagen vorhanden sind. Es ist jedoch nicht bekannt, ob es sich um aktives Enzym, das Zymogen, Prokollagenase oder Enzym handelt, das durch Proteine aus Plasma oder Zellen gehemmt ist.

II. Kollagenase - Hemmstoffe

Da alle Kollagenasen metallabhängige Enzyme darstellen, werden sie durch chelatbindende Agentien gehemmt. Starke Chelatbildner von Zn^{2+} hemmen die Kollagenase, nicht aber Zn-EDTA.

Für die Kollagenaseaktivität ist Ca^{2+} notwendig. Die Enzymaktivität wird durch Ca-EDTA (18), durch 1,10-Phenanthrolin und durch Tetraäthylen auch in Gegenwart eines Überschusses an Ca^{2+} gehemmt.

Verbindungen mit reaktiven Sulfhydrylgruppen (u. a. Cystein, Dithiothreitol, d-Penicillamin) hemmen in Konzentrationen von 1 - 10 mM die meisten Kollagenasen (4, 18, 21, 23).

III. Inhibitoren der Kollagenase

Die Regulation der Kollagenaseaktivität ist noch nicht sicher geklärt. Bisläng sind nur wenige natürliche Inhibitoren der Kollagenase bekannt, nämlich ein β_1 -Protein des Plasmas und das α_2 -Makroglobulin. Letzteres ist ein irreversibler Hemmstoff der Kollagenase. Er dürfte daher keine entscheidende Rolle im Kollagenasemetabolismus spielen.

1. Kollagenasehemmung durch α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin

Es ist schon lange bekannt, daß Serum die Kollagenasen verschiedener Gewebe inaktiviert (24). Ohlsson und Olsson (11) haben die Wirkung der Serum-inhibitoren α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin auf Kollagenase untersucht. Sie wiesen nach, daß gereinigte Granulozyten-Kollagenase natives Kollagen in Lösung zu den zwei spezifischen Fragmenten abbaut. Diese Kollagenase wird im Serum durch Komplexbildung mit α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin gehemmt, wobei beide Partner im äquimolaren Verhältnis miteinander reagieren. Die Affinität der Granulozyten-Kollagenase zu α_2 -Makroglobulin ist jedoch etwa 10 mal so groß wie zu α_1 -Antitrypsin. Die molare Konzentration des α_1 -Antitrypsins im Blut übersteigt aber die des α_2 -Makroglobulins um ungefähr den Faktor 12. Daher sind beide Inhibitoren zum Schutz vor Kollagenolyse von gleich großer Bedeutung.

Die Granulozyten-Kollagenase wird durch Komplexbildung mit jedem der beiden Inhibitoren wirkungsvoll inaktiviert. Voraussetzung ist aber, daß genügend Zeit zur Reaktion der Kollagenase mit den Inhibitoren verbleibt bevor das Kollagen-substrat zugesetzt wird.

In vielen anderen Untersuchungen wurde gefunden, daß α_1 -Antitrypsin Kollagenase nicht inaktiviert (23). Nach Ohlsson und Olsson (11) ist es aber möglich, daß diese Ergebnisse dadurch zustande gekommen sind, daß zuwenig Zeit für die Reaktion der Kollagenase mit α_1 -Antitrypsin zur Verfügung stand.

Ohlsson und Olsson (11) stellten fest, daß ein geringer aber deutlicher Transfer von Proteinasen aus dem α_1 -Antitrypsin-Enzym-Komplex zum α_2 -Makroglobulin stattfindet. α_2 -Makroglobulin scheint eine Schlüsselrolle in der Elimination von Proteasen zu spielen, da dieser Transport für mehrere Enzyme beobachtet wurde.

Die α_2 -Makroglobulin-Protease-Komplexe werden aus der Zirkulation durch Zellen des retikuloendothelialen Systems rasch

und vollständig eliminiert (14). Die Hemmung der Kollagenase-tätigkeit durch α_2 -Makroglobulin ist somit irreversibel.

Die widersprüchlichen Ergebnisse über die Hemmung der kollagenolytischen Aktivität durch α_1 -Antitrypsin waren Anlaß für weitere Untersuchungen. K. Ohlsson (10) berichtete jetzt in einer neuen Arbeit über die Ergebnisse der Kollagenolyse normaler und leukämischer polymorphkerniger Leukozyten. Er fand in den Granula beider Leukozytenarten kollagenolytische Aktivität. Mit Extrakten aus leukämischen Granula fand sich jedoch nur ein Kollagenabbau in der terminalen Region der Moleküle durch β - zu α -Konversion. Die Granulaextrakte aus normalen Leukozyten bewirkten neben dem Kollagenabbau in der terminalen Region der Moleküle auch den für Kollagenasen typischen Abbau zu den $3/4$ zu $1/4$ Fragmenten.

Bei einem Vergleich der Effekte von neutraler Granulozytenprotease, Elastase und spezifischer Kollagenase aus den Granula normaler Leukozyten stellte Ohlsson fest, daß sowohl neutrale Granulozytenprotease als auch Elastase Kollagen vom terminalen Ende her durch Umwandlung der β - zur α -Form abbauen, während nur die spezifische Kollagenase Kollagen auf die typische Weise spaltet.

Die spezifische Kollagenase ließ sich bisher nur in normalen Granulozyten nachweisen. In Granulozyten bei chronisch myeloischer Leukämie fand sich keine echte Kollagenase.

Weiterhin stellte Ohlsson fest, daß das in seinen früheren Arbeiten als spezifische Kollagenase bezeichnete Enzym eine neutrale Granulozytenprotease ist, die Kollagenmoleküle zwar abbaut, jedoch auf die gleiche Weise wie Elastase und nicht wie Kollagenase. Diese neutrale Granulozytenprotease wird inaktiviert durch Komplexbildung mit α_1 -Antitrypsin und mit α_2 -Makroglobulin. Es besteht ein äquimolares Bindungsverhältnis mit α_2 -Makroglobulin und der neutralen Protease. Das gleiche äquimolare Bindungsverhältnis besteht auch zwischen α_2 -Makroglobulin und der spezifischen Granulozytenkollagenase.

2. β_1 -Antikollagenase

Woolley, Roberts und Evanson (24, 25) fanden im menschlichen Serum einen weiteren Inhibitor der Kollagenase, der in der Elektrophorese als einfache Proteinbande in der Position der β_1 -Serumproteine wandert. Er wurde deshalb als β_1 -Antikollagenase bezeichnet.

Dieser Kollagenasehemmstoff mit einem Molekulargewicht von 40 000 hemmt menschliche Kollagenasen der Haut, der rheumatischen Synovia, der Magenmukosa und der Granulozyten, nicht aber die neutralen Proteasen Trypsin und Papain sowie weitere Proteinasen aus verschiedenen Enzymklassen. Daraus ist auf eine hohe Spezifität des Enzyms bzw. des Inhibitors zu schließen. Die β_1 -Antikollagenase ist demnach ein spezifischer Hemmstoff der menschlichen Kollagenasen.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die vier untersuchten Kollagenasen unterschiedlich stark von der β_1 -Antikollagenase gehemmt werden. So ist beispielsweise das Granulozytenenzym der Hemmung gegenüber wesentlich resistenter als das Magenmukosaenzym. Ursache dafür ist wahrscheinlich eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Kollagenasen gegenüber dem Inhibitor.

Die vier Gewebeskollagenasen werden alle von α_2 -Makroglobulin gehemmt. Dieses Protein ist auch als wirkungsvollster Inhibitor der Kollagenase bekannt. Bei Untersuchungen mit Serum wurden 90 % der Hemmwirkung gegen Kollagenasen in der α_2 -Makroglobulin enthaltenden Fraktion gefunden. Da die Membranen für das α_2 -Makroglobulin (Molekulargewicht ungefähr 725 000) nicht permeabel sind, ist es als Inhibitor in den Geweben von geringer Bedeutung. Hier dürfte das kleinere β_1 -Protein mit einem Molekulargewicht von 40 000 die entscheidende physiologische Funktion als Regulationsfaktor der Kollagenaseaktivität haben.

Die primäre physiologische Funktion des α_2 -Makroglobulins besteht wahrscheinlich darin, Bestandteile innerhalb des Zirkulationssystems vor proteolytischen Attacken zu schützen, während β_1 -Antikollagenase als der primäre extrazelluläre Inhibitor der Kollagenasen im Gewebe fungiert (25).

3. Kollagenaseinhibitoren aus Knorpel und Aorta

Kuettner, Hiti, Eisenstein und Harper (5) stellten fest, daß die kollagenolytische Aktivität von normaler menschlicher Haut und von menschlichem hypertrophiertem Narbengewebe durch Proteinase-Inhibitoren gehemmt wird. Sie isolierten einen Inhibitor aus Rinderknorpel, Rinder-aorta und menschlichem Knorpel:

1 mm Stücke von Rinderknorpel (Rinderaorta, menschlichem Knorpel) wurden 24 h bei 4° C mit 1 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) extrahiert (1 g/10 ml). Der Extrakt wurde vom Gewebe dekantiert und die GuHCl-Konzentration auf 3 M erhöht. Der Extrakt wurde anschließend mit einer Amicon XM 50 Membran filtriert (Proteine mit einem MG über 50 000 wurden so abgetrennt) und das Filtrat mittels einer Spectrapor Nr. 3 Membran entsalzt (Proteine mit einem MG unter 3 000 werden dabei ausgeschlossen). Anschließend wurde eine Affinitätschromatographie über ein unlösliches Trypsinderivat durchgeführt. Man erhielt so ein Protein, das mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese überprüft wurde. Die Chromatographie mit Sephadex G 75 in 3 M GuHCl ergab ein Material mit niedrigerem MG als Lysozym, nämlich von ca. 11 000 für den Inhibitor. In der Zelluloseacetat-Elektrophorese (pH 8,4) wanderte der Inhibitor als kationisches Protein.

Die so erhaltenen Inhibitoren aus Rinderknorpel und -aorta wurden dann auf ihre Hemmwirkung gegenüber der Kollagenase untersucht. Bereits mit 5 µg Knorpelinhibitor wurden 35 %, mit 25 µg 100 % Hemmung der kollagenolytischen Aktivität erreicht. Mit 8 µg Aorteninhibitor wurden 25 %, mit 20 µg fast 100 % Hemmung der Kollagenase erreicht. Der Effekt des menschlichen Knorpelinhibitors auf kollagenolytische Aktivität wurde mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese visualisiert.

Andere Proteinase-Inhibitoren wie Rinderpankreas-Trypsin-inhibitor (Kunitz) und Sojabohnen-Trypsininhibitor (Kunitz) zeigten nur minimale Wirkung auf die Kollagenaseaktivität.

Trypsin wurde von den isolierten Inhibitoren gehemmt.

In einer anderen Arbeit zeigten Sorgente, Kuettner und Eisenstein (19), daß die aus Rinderknorpel und -aorta isolierten Inhibitoren zusätzlich Trypsin und Chymotrypsin hemmen.

Lysozym, ebenfalls ein kationisches Protein wie der basische Rinder-Trypsininhibitor mit einem MG von 14 000, hatte keinen Effekt auf die Kollagenaseaktivität (5).

IV. Eigene Arbeiten zur Isolierung der von Kuettner und Mitarb. beschriebenen Inhibitoren

Der experimentelle Teil der Arbeit bestand darin, die Befunde von Kuettner, Hiti, Eisenstein und Harper (5) nachzuarbeiten. Ziel des Versuches war es, den von diesen Autoren beschriebenen Kollagenaseinhibitor aus Rinderaorta zu isolieren und dann eingehend zu charakterisieren.

1. Material und Methoden

Das Untersuchungsmaterial (Aorta) stammte von zwei frisch geschlachteten Rindern aus dem Schlachthof. Es wurde in eisgekühlter 0,9 % NaCl-Lösung ins Institut transportiert. Hier wurde sämtliches umgebende Binde- und Fettgewebe abpräpariert und die Präparate anschließend gewogen. Jede Aorta hatte ein Gewicht von etwa 160 g. Mit dem Skalpell wurden ca. 10 g schwere Stücke geschnitten und in physiologischer NaCl-Lösung im Kühlschrank gelagert. Ein ca. 5 g schweres Stück wurde sofort weiterverarbeitet. Die übrigen Teile wurden ca. 6 h nach Erhalt im Schlachthof in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und aufbewahrt.

Zum Homogenisieren wurde ein Homogenisator der Fa. Braun, Melsungen, Typ 853202, benutzt.

Zentrifugiert wurde mit einer Deckmann-Zentrifuge, Modell L 3 - 50 Ultrazentrifuge.

Die Amiconzelle und die Amiconmembranen stammten von der Fa. Amicon Corporation, Lexington, Mass., USA. Es wurden folgende Membranen benutzt:

XM 50 Membran: Moleküle mit einem MG unter 50 000 werden abgetrennt

UM 2 Membran: Moleküle mit einem MG unter 2 000 werden abgetrennt

UM 5 Membran: Moleküle mit einem MG unter 5 000 werden abgetrennt

Die Membranen wurden vor dem Gebrauch 1 h in Aqua bidest. mit einmaligem H₂O-Wechsel eingeweicht.

Zur Dialyse wurden Visking-Dialysiermembranen der Fa. Roth verwendet.

Das Photometer stammte von der Fa. Eppendorf (Küvettenwechselausw. 2702).

Zu den Enzymtesten wurden folgende Substanzen verwendet:

L-BAPA = Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid von der Fa. Merck
Trypsin vom Rind, krist., von der Fa. Merck, Aktivität 3,5 U/mg.

Suphepa = Succinylphenylalanin-4-nitroanilid von der Fa.
Böhringer

-Chymotrypsin vom Rind, krist., von der Fa. Merck,
Aktivität 45 mU/mg.

SANA = Suc-(Ala)₃-pNA von der Fa. Protein Research
Foundation, Japan

Elastase aus Schweinepankreas von der Fa. Merck,
Aktivität 80 E/mg.

2. Enzymteste

Trypsin - Inhibitortest

Photometer: Messung bei 405 nm

Trypsin: 30 mg Trypsin in 250 ml 0,0025 n HCl

L-BAPA: 1 g L-BAPA wurden in 2 l Aqua bidest. gelöst

Puffer: 0,2 M Triäthanolamin-HCl, pH 7,8

Testvolumen: 3 ml

Testansatz in der Küvette:

Puffer 1,9 - x ml

Trypsin 0,1 ml

mischen

Probenvolumen x ml (von 0 - 300 μ l)

mischen, 5 Minuten inkubieren

L-BAPA 1,0 ml

mischen, 5 Minuten lang jede Minute Extinktion ablesen

Chymotrypsin - Inhibitor test

Photometer: Messung bei 405 nm

Chymotrypsin: 20 μ g Chymotrypsin in 100 μ l 0,0025 n HCl

Suphepa: 25 mg Suphepa gelöst in 10 ml 0,2 M TRA + 0,02 M Ca^{2+} ,
pH 7,8

Puffer: 0,2 M Triäthanolamin-HCl + 0,02 M Ca^{2+} , pH 7,8

Testvolumen: 3 ml

Testansatz in der Küvette:

Puffer 1,9 - x ml

Chymotrypsin 0,1 ml

mischen

Probenvolumen x ml (0 - 300 μ l)

mischen, 5 Minuten inkubieren

Suphepa 1,0 ml

mischen, 30 Minuten lang jede Minute Extinktion ablesen

Elastase - Inhibitortest

Photometer: Messung bei 405 nm

Elastase: 0,1 μ g in 0,1 ml 0,0025 n HCl

SANA: 1,35 mg in 1 ml TRA

Puffer: 0,2 M Triäthanolamin-HCl, pH 7,8

Testvolumen: 3 ml

Testansatz in der Küvette:

Puffer 1,9 - x ml

Elastase 0,1 ml

mischen

Probenvolumen x ml (0 - 300 μ l)

mischen, 5 Minuten inkubieren

SANA 1,0 ml

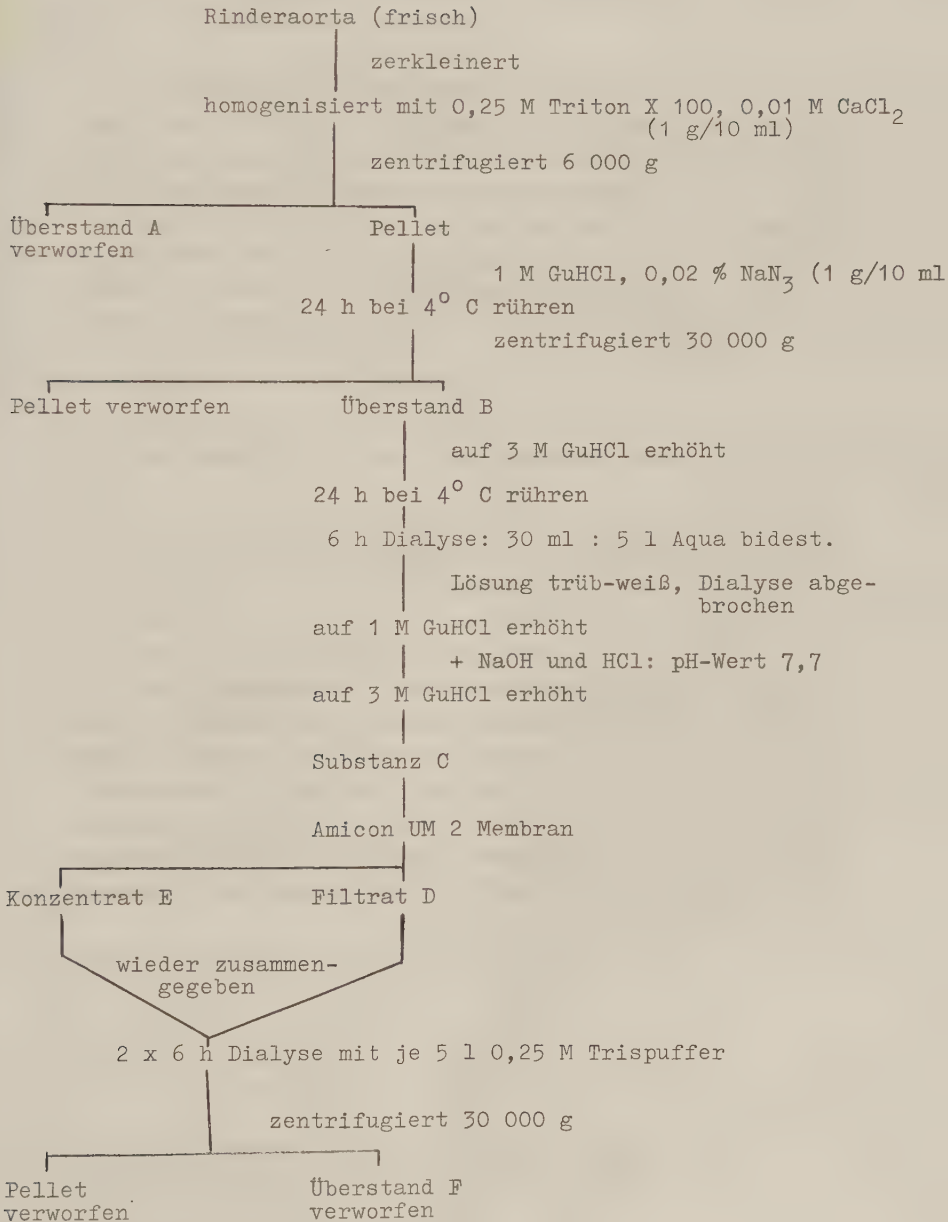
mischen, 10 Minuten lang jede Minute Extinktion ablesen

3. Aufarbeitung und Extraktion der Rinderaorta

1. Programm: Extraktion mit Triton und GuHCl

Ein etwa 5 g schweres, nicht tiefgefrorenes Stück der gereinigten und in 0,9 % NaCl gelagerter Aorta wurde mit Skalpell und Schere unter ständiger Kühlung im Eisbad in ca. 1 mm große Stückchen geschnitten. 4 g davon wurden mit 40 ml 0,25 M Triton X 100 ($\hat{=}$ Verhältnis 1 g/10 ml) versetzt. Diese Suspension wurde im Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat (mit Aqua bidest. austariert) wurde bei 2° C 20 Minuten mit 6 000 g zentrifugiert. Der Überstand A hatte einen pH-Wert von 6,52 und wurde nach der Testung verworfen. Das Sediment mit einem Gewicht von 3,57 g wurde mit 1 M GuHCl und 0,02 % NaN_3 (Verhältnis 1 g/10 ml) versetzt. Die pH-Messung ergab einen Wert von 5,35. Dann wurde 22 h bei 4° C unter Rühren extrahiert. Anschließend wurde 20 Minuten bei 2° C mit 30 000 g zentrifugiert. Das Pellet (4,14 g) wurde verworfen und der Überstand B ausgetestet. Die Konzentration des GuHCl wurde im Überstand auf 3 M erhöht. Extrahiert wurde wieder bei 4° C, 17 h unter Rühren. Der pH-Wert betrug 5,7. Die anschließende Dialyse von 30 ml Extrakt gegen 5 l Aqua bidest. wurde nach 6 h abgebrochen, da das Dialysat trüb-weiß wurde (pH 5,75). Zu dem Dialysat (35 ml) wurde 1 M GuHCl hinzugefügt. Die Flüssigkeit wurde etwas klarer und die GuHCl-Konzentration weiter auf 3 M erhöht. Der pH-Wert wurde mit NaOH und HCl auf einen Wert von 7,7 gebracht. Die Substanz C wurde ausgetestet und in der Amiconzelle mit einer UM 2 Membran von 30 ml auf 10 ml konzentriert. Sowohl der Überstand D als auch das Konzentrat E blieben klar und wurden wieder zusammengemischt.

Diese Substanz wurde erneut dialysiert, und zwar 2 mal 6 h gegen je 5 l 0,25 M Trispuffer, pH 7,0. Anschließend wurde das Dialysat bei 4° C 20 Minuten mit 30 000 g zentrifugiert. Der Überstand F, pH 7,45, wurde ausgetestet und dann mit dem Pellet verworfen.

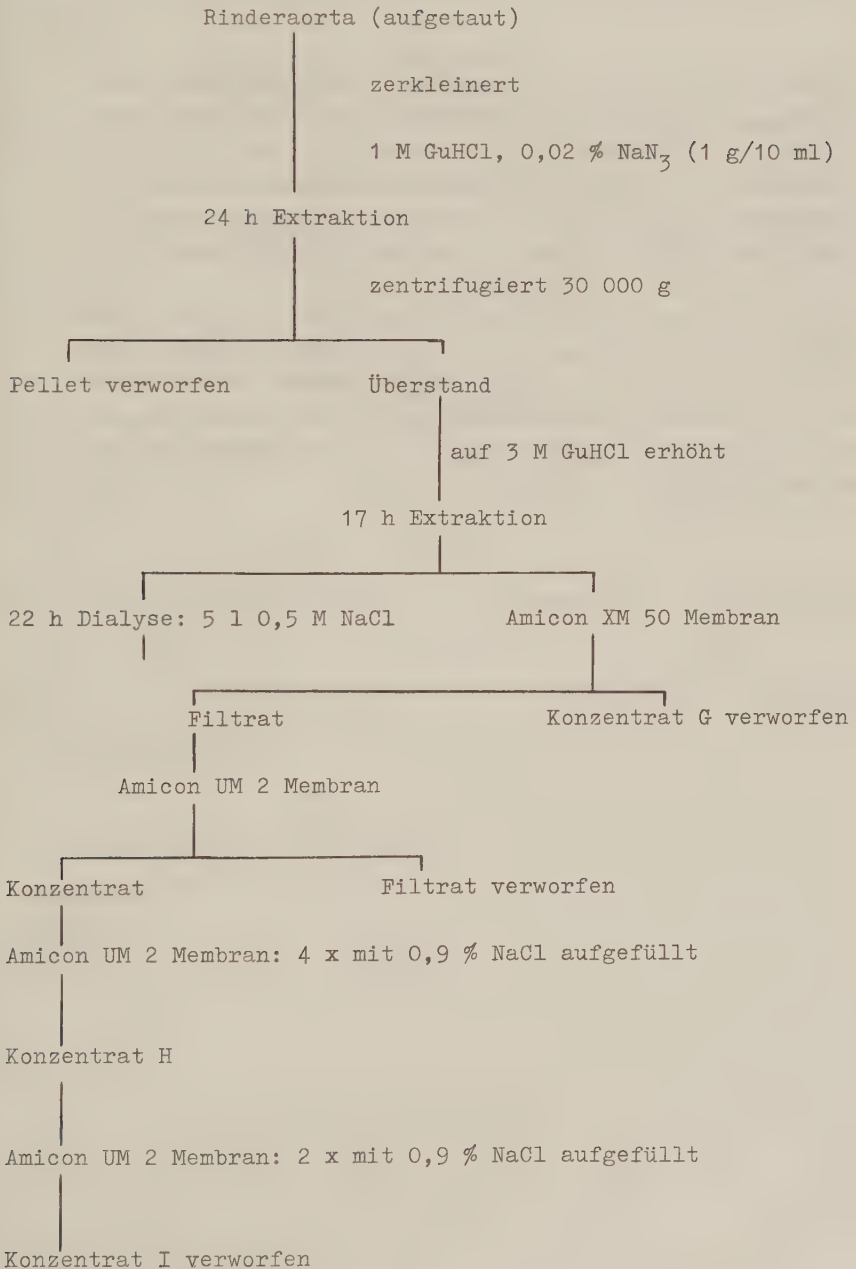
Schema der Aufarbeitung

2. Programm: Extraktion mit GuHCl , ohne Triton

Ein Stück der tiefgefrorenen Aorta wurde aufgetaut, in 0,9 % NaCl gelagert und mit Skalpell und Schere unter ständiger Kühlung im Eisbad in 1 mm Stücke geschnitten. Davon wurden 3,5 g mit 35 ml 1 M GuHCl und 0,02 % NaN_3 versetzt (Verhältnis 1 g/10 ml) und bei 4° C 24 h unter Rühren extrahiert. Zentrifugiert wurde bei 4° C 20 Minuten mit 30 000 g, das Pellet verworfen und im Überstand die Konzentration des GuHCl von 1 auf 3 M erhöht und nochmals 17 h bei 4° C extrahiert.

Die Substanz wurde dann auf zwei Wegen weiterverarbeitet:

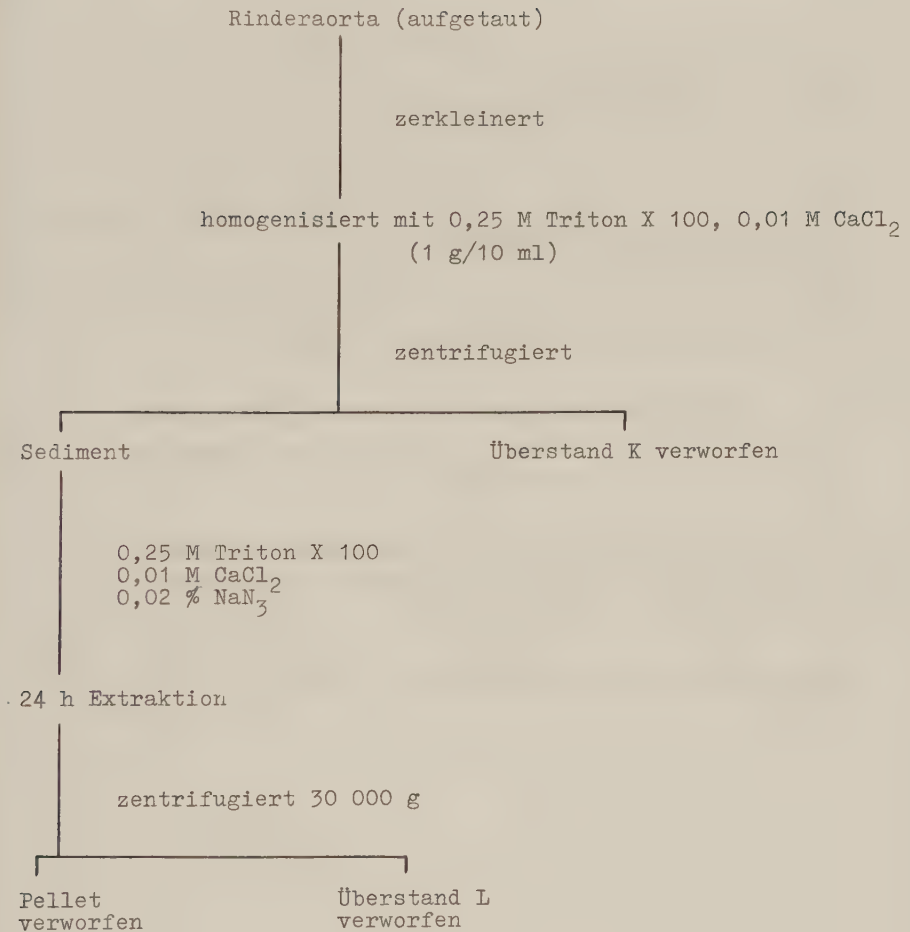
- 30 ml wurden gegen 5 l 0,5 M NaCl dialysiert. Die Dialyse wurde jedoch nach 22 h abgebrochen, da sowohl das Dialysat als auch die NaCl -Lösung trüb wurden.
- Etwa 10 ml wurden in einer Amiconzelle mit einer XM 50 Membran innerhalb von 5 h auf 2 ml konzentriert. Das Konzentrat G wurde ausgetestet und verworfen, das Filtrat (ca. 8,5 ml) mit einer Amiconmembran UM 2 entsalzt. Dazu wurde die Amiconzelle 4 mal mit 42 ml 0,9 % NaCl aufgefüllt, das Konzentrat H ausgetestet (GuHCl -Konzentration ungefähr 0,0048 M) und noch 2 mal mit 0,9 % NaCl entsalzt (GuHCl -Konzentration 0,00019). Nach nochmaliger Testung wurde das Konzentrat I verworfen.

Schema der Aufarbeitung

3. Programm: Extraktion nur mit Triton, ohne GuHCl

Aufgetaute Aorta wurde wie bereits in den vorhergehenden Programmen beschrieben zerkleinert. 4,89 g der Aorta wurden mit 48,9 ml 0,25 M Triton X 100 und 0,01 M CaCl_2 , pH 5,1 (Verhältnis 1 g/10 ml) im Homogenisator homogenisiert. Anschließend wurde bei 4° C 20 Minuten mit 6 000 g zentrifugiert. Der Überstand K wurde nach der Testung verworfen.

Das Sediment mit 4,052 g wurde im Verhältnis 1 g/10 ml mit 0,25 M Triton X 100 und 0,01 M CaCl_2 und 0,02 % NaN_3 versetzt und bei 4° C 24 h unter Rühren extrahiert. Die Substanz wurde bei 4° C 20 Minuten mit 30 000 g zentrifugiert, der Überstand L ausgetestet und ebenso wie das Pellet verworfen.

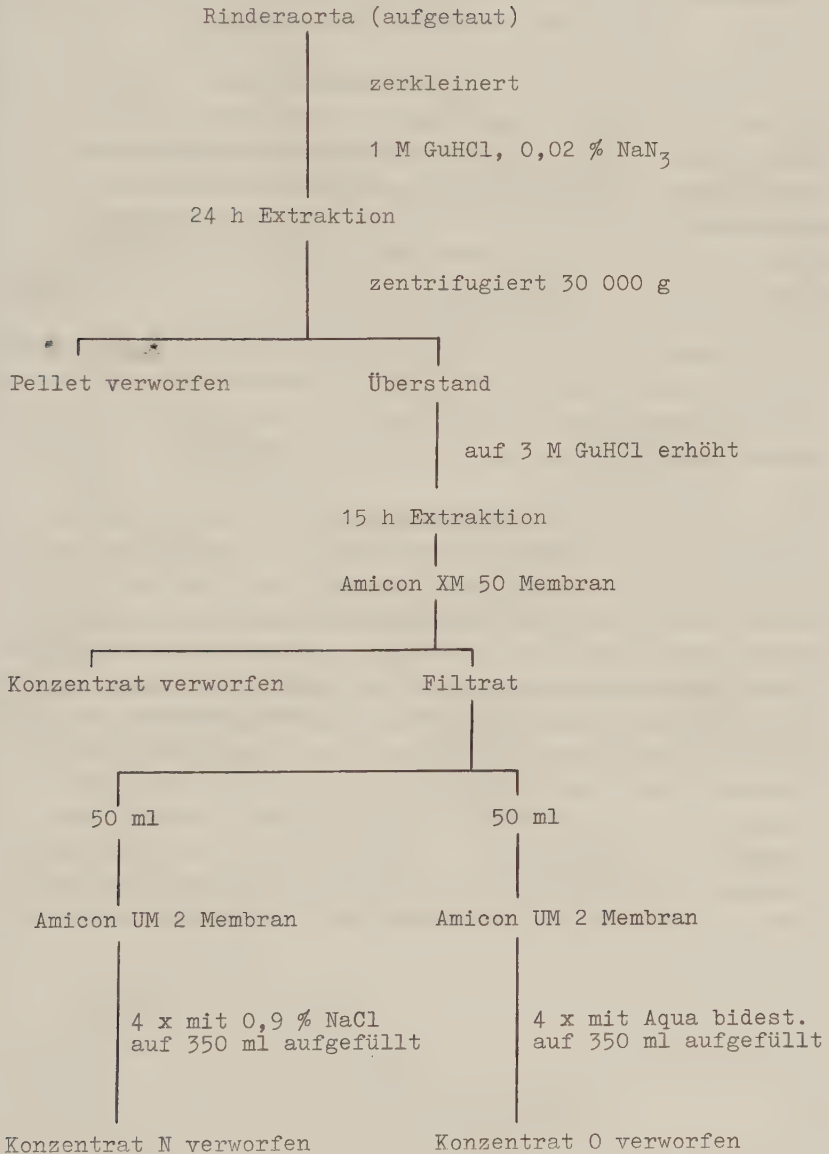
Schema der Aufarbeitung

4. Programm: Extraktion mit GuHCl , ohne Triton

Wiederum wurde aufgetaute Aorta (13,5 g) wie bereits beschrieben zerkleinert und im Verhältnis 1 g/10 ml mit 1 M GuHCl und 0,02 % NaN_3 versetzt. Die Substanz wurde bei 4°C 24 h unter Rühren extrahiert und anschließend bei 4°C 20 Minuten mit 30 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Im Überstand erhöhten wir die Konzentration des GuHCl auf 3 M und extrahierten bei 4°C 15 h unter Rühren. Dann filtrierten wir in der Amiconzelle mit einer XM 50 Membran. Das Konzentrat M wurde nach der Testung verworfen, während das Filtrat geteilt wurde:

- 50 ml wurden in der Amiconzelle mit einer UM 2 Membran 4 mal mit 300 ml 0,9 % NaCl filtriert. Das Konzentrat N wurde ausgetestet und verworfen.
- 50 ml wurden in der Amiconzelle mit einer UM 2 Membran 4 mal mit 300 ml Aqua bidest. filtriert. Das Konzentrat O wurde ausgetestet und verworfen.

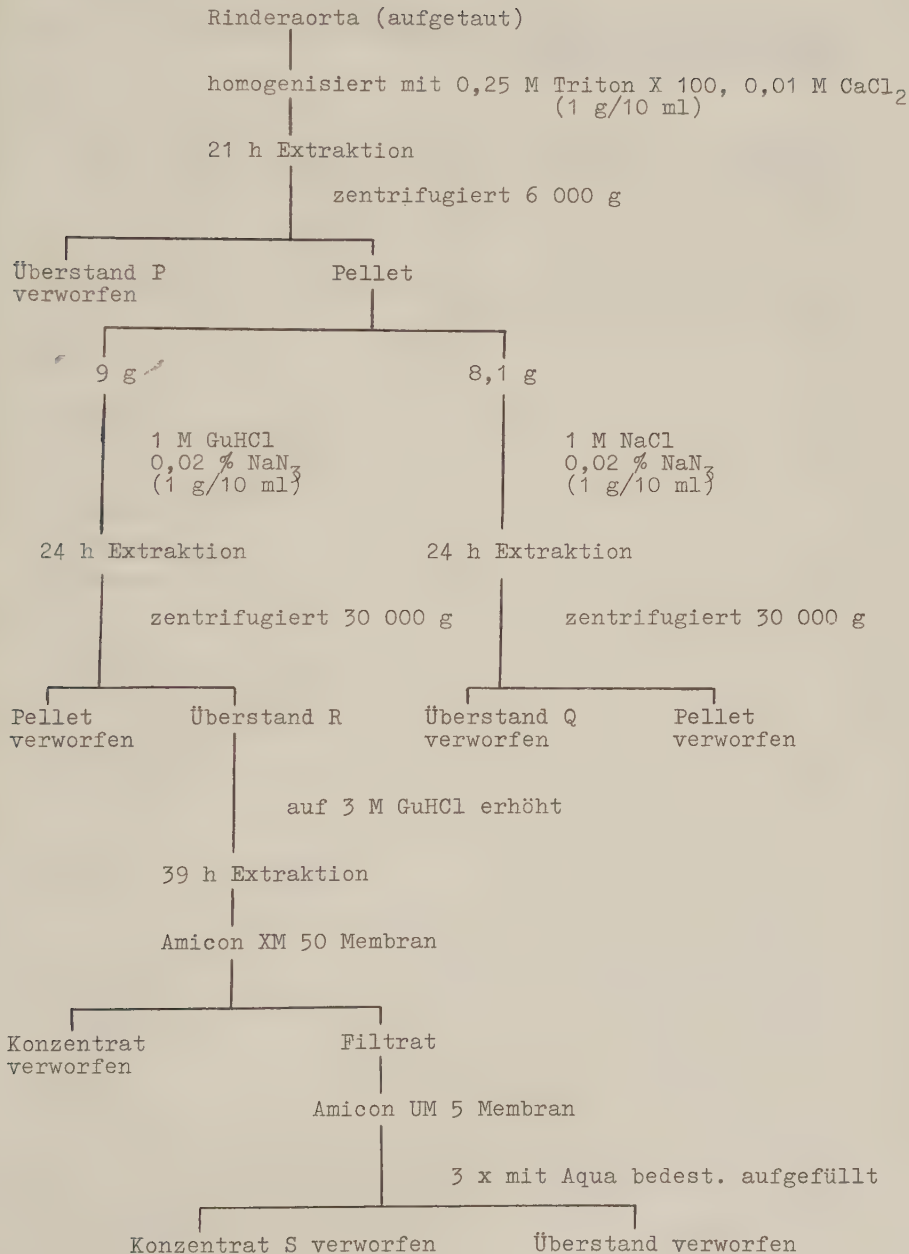
(Die GuHCl -Konzentration müßte auf 0,009 M abgefallen sein).

Schema der Aufarbeitung

5. Programm: Extraktion mit Triton und NaCl
Extraktion mit Triton und GuHCl

Aufgetaute, wie üblich zerkleinerte Aorta wurde mit 0,25 M Triton X 100 und 0,01 M CaCl_2 versetzt, im Homogenisator homogenisiert und 21 h bei 4°C unter Rühren extrahiert. Anschließend wurde bei 4°C 20 Minuten mit 6 000 g zentrifugiert. Der Überstand P wurde nach der Testung verworfen während das Pellet aufgeteilt wurde:

- 8,1 g wurden mit 81 ml 1 M NaCl und 0,02 % NaN_3 (Verhältnis 1 g/10 ml) versetzt, 24 h bei 4°C extrahiert und bei 4°C 20 Minuten mit 30 000 g zentrifugiert. Der Überstand Q wurde ausgetestet und mit dem Pellet verworfen.
- 9 g wurden mit 90 ml 1 M GuHCl und 0,02 % NaN_3 (Verhältnis 1 g/10 ml) versetzt, 24 h bei 4°C extrahiert und bei 4°C 20 Minuten mit 30 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Im Überstand R wurde nach der Testung die GuHCl-Konzentration auf 3 M erhöht und bei 4°C 39 h extrahiert und in einer Amiconzelle mit einer XM 50 Membran filtriert. Das Konzentrat wurde verworfen, während das Filtrat (8 ml) in einer Amiconzelle mit einer XM 5 Membran und Aqua bidest. (48 ml) 3 mal zur Entsalzung filtriert wurde. Die GuHCl-Konzentration müßte danach 0,009 M betragen. Es wurde jedoch 2 mal nicht bis 8 ml herunterkonzentriert und somit die errechnete Molarität von 0,009 M GuHCl nicht erreicht. Das Konzentrat S wurde nach der Testung verworfen.

Schema der Aufarbeitung

4. Überprüfung der Wirkung des GuHCl auf Trypsin, Chymotrypsin und Elastase

Es wurde die Wirkung des GuHCl auf Trypsin, Chymotrypsin und Elastase überprüft. Folgende Molaritäten des GuHCl wurden getestet:

3 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M, 0,125 M, 0,06 M, 0,03 M, 0,016 M, 0,0078 M, 0,0039 M, 0,00195 M.

5. Übersicht über alle getesteten Substanzen

	Trypsin	Chymotrypsin	Elastase
1. Programm:			
Mit Triton und GuHCl			
Überstand A	x		
Überstand B	x		
Substanz C	x	x	
Überstand D	x		
Konzentrat E	x		
Überstand F	x	x	x
2. Programm:			
Mit GuHCl, ohne Triton			
Konzentrat G	x		
Konzentrat H	x		
Konzentrat I	x	x	x
3. Programm:			
Mit Triton, ohne GuHCl			
Überstand K	x		
Überstand L	x		x
4. Programm:			
Mit GuHCl, ohne Triton			
Konzentrat M	x	x	x
Konzentrat N	x	x	x
Konzentrat O	x	x	x
5. Programm:			
Mit Triton und NaCl			
Überstand P	x	x	x
Überstand Q	x	x	x

Trypsin Chymotrypsin Elastase

Mit Triton und GuHCl

Überstand R	x	x	x
Konzentrat S	x	x	x

GuHCl-Reihe

3 M	x	x	
1 M	x	x	x
0,5 M	x		
0,25 M	x		
0,06 M	x		
0,03 M	x		
0,016 M	x		
0,0078 M	x		
0,0039 M	x		
0,00195 M	x		

x = getestet

V. Ergebnisse

Ergebnisse der Enzym-Inhibitorteste

	Trypsin	Chymotrypsin	Elastase
1. Programm:			
Mit Triton und GuHCl			
Überstand A	-		
Überstand B	++		
Substanz C *	+	-	
Überstand D	+		
Konzentrat E	+		
Überstand F	-	-	-
2. Programm:			
Mit GuHCl, ohne Triton			
Konzentrat G	++ ↑		
Konzentrat H	(+)		
Konzentrat I	-	-	-
3. Programm:			
Mit Triton, ohne GuHCl			
Überstand K	-		
Überstand L	-		-
4. Programm:			
Mit GuHCl, ohne Triton			
Konzentrat M	++	-	-
Konzentrat N	-	- ↑	-
Konzentrat O	-	-(↑)	-
5. Programm:			
Mit Triton und NaCl			
Überstand P	-	-	-
Überstand Q	-	-	-

Trypsin Chymotrypsin Elastase

Mit Triton und GuHCl

Überstand R	++	-	-
Konzentrat S	(+)	-	-(↑)

GuHCl-Reihe

3 M	++	-(↑)	
1 M	++	-	-(↑)
0,5 M	+		
0,25 M	+		
0,06 M	+		
0,03 M	(+)		
0,016 M	-		
0,0078 M	-		
0,0039 M	-		
0,00195 M	-		

+ = Hemmung

- = keine Hemmung

↑ = Aktivierung

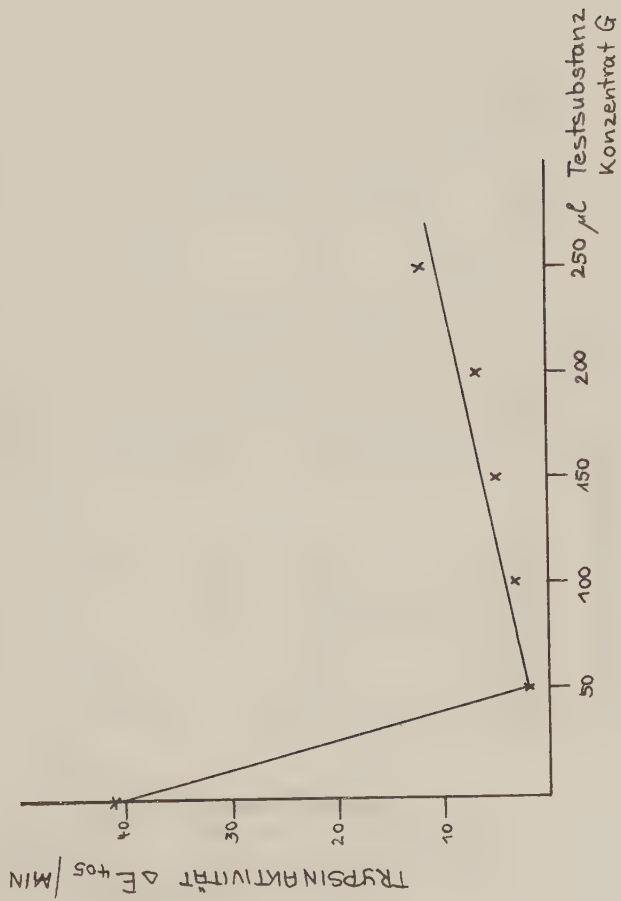
() = schwache Wirkung

++ = starke Wirkung

* Substanz C wurde zum Testen im Verhältnis 1 : 10 mit 0,9 % NaCl verdünnt, um unterschiedliche pH-Werte auszugleichen und um im Bereich zwischen 0 und 100 μ g genauer zu messen.

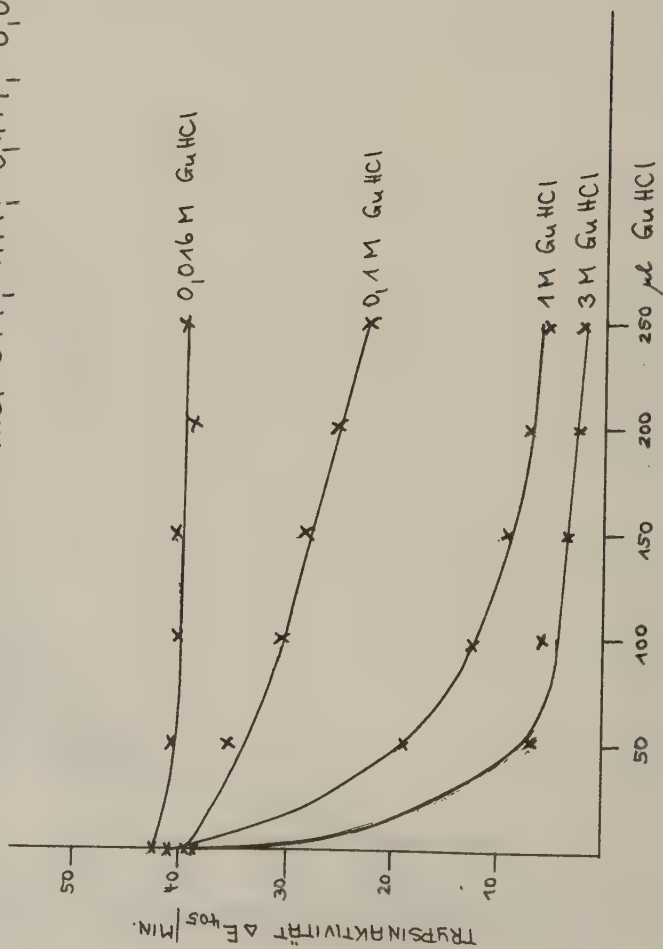
TRYPsin - INHIBITORTEST

TESTSUBSTANZ : KONZENTRAT G



TRYPsin - INHIBITORTEST

TESTSUBSTANZ : GuHCl 3 M; 1 M; 0,1 M; 0,016 M



Bereits bei den ersten Untersuchungen der inhibitorischen Wirkung auf Trypsin, Chymotrypsin und Elastase fiel auf, daß Trypsin von allen Substanzen, die mit GuHCl extrahiert worden waren, gehemmt wurde. Eine solche Hemmwirkung fand sich nicht, wenn die Aortenstücke mit NaCl oder Triton behandelt worden waren. Die Vermutung lag nahe, daß die Hemmwirkung durch GuHCl verursacht wurde. Es wurde also die Wirkung von GuHCl auf Trypsin, Chymotrypsin und Elastase untersucht. Das Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen überein:

Chymotrypsin und Elastase wurden von GuHCl nicht beeinflusst, während sich bei Trypsin eine sehr starke Hemmung fand. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 3 M GuHCl bis zu 0,00195 M GuHCl angewandt. Erst bei einer GuHCl-Konzentration von 0,016 M fand sich keine Hemmung mehr.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde nun versucht, GuHCl wieder aus den Substanzen zu entfernen. Im 1. Programm wurde das durch eine Dialyse erreicht. Da aber bei der Dialyse (Überstand F) alle Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 20 000 abgetrennt werden, war eine Hemmung nicht zu erwarten, da der gesuchte Inhibitor ein Molekulargewicht von 11 000 hat und sich somit auch nicht mehr im Dialysat befunden hätte.

Die im 2. Programm gefundene starke Hemmung im Konzentrat G dürfte auch wieder auf GuHCl zurückzuführen sein. Daher wurde in einer Amiconzelle mit einer UM 2 Membran entsalzt. Nach viermaligem Durchlauf sollte die GuHCl-Konzentration auf 0,0048 M abgefallen sein. Die gemessene, geringe Hemmung von Trypsin war nach weiterem zweimaligen Entsalzen völlig aufgehoben.

Die im Konzentrat G gefundene Aktivierung des Trypsins dürfte auf eine andere aktive Protease zurückzuführen sein.

Der 3. Extraktionsvorgang fand nur mit Triton statt. Es fand sich nirgends eine Inhibitorwirkung.

Sowohl im 4. als auch im 5. Arbeitsablauf fand sich in den Präparationen, die GuHCl enthielten, eine inhibitorische Wirkung. Die Stärke dieser Hemmung war abhängig von der Konzentration des GuHCl. Die Aktivierung von Chymotrypsin dürfte wiederum auf eine andere aktive Protease zurückzuführen sein.

In der GuHCl-Verdünnungsreihe fand sich die beschriebene Hemmung von Trypsin. Weiterhin fand sich eine geringe Aktivierung von Chymotrypsin mit 3 M GuHCl und eine leichte Aktivierung von Elastase bei 1 M GuHCl.

Die sich in der Arbeit von Kuettner und Mitarb. (5) anschließende Affinitätschromatographie wurde aufgrund obiger Beobachtungen nicht mehr durchgeführt.

Aufgrund dieser unspezifischen Hemmwirkung des Extraktionsmediums ist davon auszugehen, daß die Extrakte die von Kuettner und Mitarb. beschriebenen Inhibitoren nicht enthalten bzw. die Kollagenasehemmung an einen spezifischen Inhibitor gebunden ist. Der in menschlichen Sekreten vorhandene Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor kommt mit Sicherheit in den Extrakten nicht vor.

Zusammenfassung

Kollagenasen sind wesentlich am enzymatischen Abbau nativen Kollagens beteiligt. Als natürliche Inhibitoren der Kollagenasen sind bisher nur α_2 -Makroglobulin und ein β_1 -Protein des Plasmas bekannt. Ein weiterer Inhibitor wurde von Kuettner und Mitarb. aus Rinderknorpel, Rinderaorta und menschlichem Knorpel isoliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diesen Inhibitor aus Rinderaorta zu isolieren. Dabei wurde die Hemmwirkung der einzelnen Extrakte auf Trypsin, Chymotrypsin und Elastase geprüft. Es zeigte sich, daß Trypsin von allen Extrakten, die Guanidinhydrochlorid enthielten, gehemmt wurde.

Daraufhin wurde die Wirkung von Guanidinhydrochlorid auf die Aktivitäten von Trypsin, Chymotrypsin und Elastase geprüft. Es fand sich dabei eine starke Hemmung des Trypsins. Erst ab einer Guanidinhydrochlorid-Konzentration von 0,016 M war keine Hemmwirkung nachweisbar. Chymotrypsin und Elastase wurden von Guanidinhydrochloridhaltigen Lösungen bzw. den Extrakten nicht gehemmt.

Aufgrund dieser unspezifischen Hemmwirkung des Extraktionsmediums ist davon auszugehen, daß die Extrakte die von Kuettner und Mitarb. beschriebenen Inhibitoren nicht enthalten bzw. die Kollagenasehemmung an einen spezifischen Inhibitor gebunden ist. Der in menschlichen Sekreten vorhandene Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor kommt mit Sicherheit in den Extrakten nicht vor.

Literaturangabe:

1. Ehrlich M. G., Mankin H. J., Jones H., Wright R., Crispen C., Vigliani G.

Collagenase and collagenase inhibitors in osteoarthritic and normal human cartilage.

J. Clinical Invest. 59, 1977, S. 226 - 233

2. Eisenstein R., Kuettner K. E., Soble L. W., Sorgente N.

Tissue inhibitors are cell growth regulators.

Proteins and Related Subjects, Vol. 23

H. Peeters: Proteides of the Biological Fluids

Proceedings of the 23. Coll., Brugge 1975, S. 217 - 219

3. Gross J., Lapiere C. M.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 48, 1965, S. 1197 - 1204

4. Harris E. D. Jr., Cartwright E. C.

Mammalian Collagenases

Proteinases in Mammalian Cells and Tissues

(ed. A. J. Barrett) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press 1977, S. 249 - 283

5. Kuettner K. E., Hiti J., Eisenstein R., Harper E.

Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta.

Biochem. and Biophys. Res. Comm., Vol. 72, 1976, S. 40 - 46

6. Kuettner K. E., Soble L., Croxon R. L., Marczyńska B., Hiti J., Harper E.

Tumor cell collagenase and its inhibition by a cartilage-derived protease inhibitor.

Science Vol. 196, 1976

7. Kuettner K. E., Soble L. W., Sorgente N., Eisenstein R.

The possible role of protease inhibitors in cartilage metabolism.
Proteins and Related Subjects, Vol. 23

H. Peeters: Proteides of the Biological Fluids

Proceedings of the 23. Coll., Brugge 1975, S. 221 - 225

8. Macartney H. W., Tschesche H.

Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes
and activation to collagenase by removal of an inhibitor.

FEBS Letters , Vol. 119, Number 2, 1980, Elsevier/North Holland
Biomedical Press, S. 327 - 332

9. Murphy G., Cartwright E. C., Sellers A., Reynolds J. J.

The detection and characterisation of collagenase inhibitors
from rabbit tissues in culture.

Biochem. and Biophys. Acta 483, 1977, S. 493 - 498

10. Ohlsson K.

Polymorphonuclear leucocyte collagenase.

Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues

Edited by D. E. Woolley and J. M. Evanson,

1980 John Wiley & Sons Ltd., S. 209 - 222

11. Ohlsson K., Olsson J.

Neutral proteases of human granulocytes. IV. Interaktion
between human granulocyte collagenase and plasma protease
inhibitors.

J. Lab. Clin. Med., Vol. 89, 1977, S. 269 - 277

12. Ohlsson K., Olsson J., Spitznagel J. K.

Localisation of chymotrypsin-like cationic protein, colla-
genase and elastase in azurophil granules of human neutro-
philic polymorphonuclear leucocytes.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie, Bd. 358, März 1977,
S. 361 - 366

13. Ohlsson K., Olsson J., Tynelius-Bratthall G.

Neutrophil leucocyte collagenase, elastase and serum protease inhibitors in human gingival crevices.

Acta Odont. Scand. 31, 1973, S. 51 - 59

14. Ohlsson K., Skude G.

Demonstration and semiquantitative determination of complexes between various proteases and human α_2 -Makroglobulin.

Clinica Chimica Acta, 66, 1976, S. 1 - 7

15. Roughley P. J., Murphy G., Barrett A. J.

Proteinase inhibitors of bovine nasal cartilage.

Biochem. J. 1978, S. 721 - 724

16. Sellers A., Reynolds J. J.

Identification and partial characterisation of an inhibitor of collagenase from rabbit bone.

Biochem. J. 1977, S. 353 - 360

17. Seltzer J. L., Eisen A. Z., Jeffrey J. J., Feder J.

A component of normal human serum which enhances the activity of vertebrate collagenases.

Biochem. and Biophys. Res. Comm., Vol. 80, 1978, S. 637 - 645

18. Seltzer J. L., Jeffrey J. J., Eisen A. Z.

Evidence for mammalian collagenases as zinc-ion.

Biochem. et Biophys. Acta, 485, 1977, S. 179 - 187

19. Sorgente N., Kuettner K. E., Eisenstein R.

The isolation, purification and partial characterisation of proteinase inhibitors from bovine cartilage and aorta.

Proteins and Related Subjects, Vol. 23

H. Peeters: Proteides of the Biological Fluids

Proceedings of the 23. Coll., Brugge 1975, S. 227 - 231

20. Venge P., Olsson J., Odeberg H.

Cationic proteins of human granulocytes. V. Interaction with plasma protease inhibitors.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1975, S. 737 - 744

21. Woolley D. E., Akroyd C., Evanson J. M., Soames J. V., Davies R. M.

Characterisation and serum inhibition of neutral collagenase from cultured dog gingival tissue.

Biochem. et Biophys. Acta 522, 1978, S. 205 - 217

22. Woolley D. E., Evanson J. M.

Collagenase and its natural inhibitors in relation to the rheumatoid joint.

Conn. Tissue Res. 1977, Vol. 5, S. 31 - 35

23. Woolley D. E., Glanville R. W., Roberts D. R., Evanson J. M.

Purification, characterisation and inhibition of human skin collagenase.

Biochem. J. 1978, S. 265 - 276

24. Woolley D. E., Roberts D. R., Evanson J. M.

Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein.

Biochem. and Biophys. Res. Comm., Vol. 66, Nr. 2, 1975, S. 747 - 754

25. Woolley D. E., Roberts D. R., Evanson J. M.

Small molecular weight β_1 -serum protein which specifically inhibits human collagenases.

Nature, Vol. 261, 1976, S. 325 - 327

Lebenslauf

Name: Edeltraud Rodegast, geb. Pommer

Geburtstag, -ort: 9. September 1947, Landshut

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Siegfried Pommer, geb. 5. 3. 1913, Beamter i. R.

Maria Pommer, geb. Schäfferer, geb. 28. 12. 1917, Hausfrau

Familienstand: Verheiratet seit 17. 10. 1975 mit

Karl-Ludwig Rodegast

Kind: Peter Rodegast, geb. 26. 5. 1979

Schulausbildung und Berufstätigkeit:

1953 - 1960 Volksschule

1960 - 1963 Städt. Riemerschmid Handelsschule, München

1963 - 1973 Buchhalterin bei der Fa. Seidl & Mayer, München

1973 Begabtenprüfung am Kultusministerium, München

1973 - 1980 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

1980 Staatsexamen und Approbation

